

Vascular dysfunction in experimental diabetes

Citation for published version (APA):

Huijberts, M. S. P. (1994). *Vascular dysfunction in experimental diabetes*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19940527mh>

Document status and date:

Published: 01/01/1994

DOI:

[10.26481/dis.19940527mh](https://doi.org/10.26481/dis.19940527mh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

Diabetes mellitus is a disease with a high prevalence in the general population. Two forms of diabetes mellitus can be distinguished. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is characterized by its juvenile onset and a state of absolute insulin deficiency caused by destruction of the insulin producing pancreatic β cells. Insulin therapy is necessary in these patients. The prevalence of IDDM is relatively low compared to the prevalence of non insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) which affects mainly older people. In NIDDM defects in insulin secretion coexist with a relative insulin resistance often related to obesity. NIDDM patients may be treated with diet only, but in most cases addition of oral agents and/or eventually insulin treatment is warranted.

Morbidity and mortality as well as quality of life of patients with diabetes mellitus are to a large extent determined by the development of vascular complications. Vascular dysfunction in diabetes has many features which vary from mild signs such as microalbuminuria and background retinopathy to severe conditions like end-stage renal failure, vision-threatening proliferative retinopathy and atherosclerosis. Because of the high prevalence of diabetes mellitus and the substantial amount of diabetic patients that develop vascular complications, diabetic angiopathy poses an important problem in health care in clinical terms as well as with respect to health care costs.

Although the development of diabetic vascular complications has been recognized already many years ago, this has not yet led to a complete understanding of the mechanisms which are responsible for its development. A number of possible etiologic mechanisms have been proposed. Glycosylation, induced by chemical reactions between proteins and circulating sugars has been shown to interfere with a number of systems important in cardiovascular regulation. Increased metabolism of glucose through the polyol pathway might induce alterations in intracellular homeostatic mechanisms such as alterations in redox potential. Finally, alterations in vasoactive or growth promoting hormones may also be involved in the development of diabetic angiopathy.

In this thesis, characteristics of vascular dysfunction were studied using an experimental diabetes model. The use of an animal model allowed us to study different aspects of vascular dysfunction at a more basal level. In the studies presented in this thesis, changes occurring in the streptozotocin-induced diabetic rat are described.

In *chapter 2* and *chapter 3* the effect is described of diabetes induction on small vessels, arterioles and venules, in a striated muscle preparation, the so-called dorsal microcirculatory chamber. Using this preparation, diameters of arterioles and venules were measured sequentially for 6-8 weeks in conscious rats.

In *chapter 2* the effects of diabetes induction on microvascular diameters and microvascular density are observed: Male Wistar Rp rats were implanted with a dorsal microcirculatory chamber at the age of 6-7 weeks. After three weeks recovery, rats were divided into a control group and a diabetic group in which diabetes was induced by i.p. injection with 70 mg/kg streptozotocin. Using intravital microscopy, recordings of selected arterioles and venules were made before diabetes induction and then weekly for a period of 6 weeks. Vessel diameters were measured off-line with an image-shearing device. In parallel, photographic pictures were taken of all the preparations; vascular densities of different vessel categories were determined from these slides using a standard grid-counting method. No effects on diameters of larger A1 and A2 arterioles were observed in diabetic animals. However, the smallest A3/A4 arterioles showed a gradual constriction after streptozotocin administration. In addition, 4 and 6 weeks after diabetes induction an increased density of venules was observed. These results indicate that also in microvascular beds -such as the striated muscle microcirculation- which are not specifically known for diabetes-related damage, vascular alterations develop already shortly after diabetes induction.

In *chapter 3* vascular reactivity of microvessels was studied using the same microcirculatory preparation. The effects of the endothelium-dependent vasodilator acetylcholine and the potassium-channel opener BRL 38227, and the vasoconstricting effects of the α 1-adrenoceptor agonist phenylephrine and angiotensin II on blood pressure and striated muscle arteriolar diameter were studied six weeks after diabetes induction, and compared with non-diabetic control rats. Changes in arteriolar diameters were measured in the cutaneous maximus muscle, using the dorsal microcirculatory chamber model. The decrease in mean arterial pressure following acetylcholine infusion was approximately 30% lower in diabetic rats. Arteriolar diameter responses to acetylcholine were markedly lower in diabetic rats; the effect was most pronounced in A2 arterioles. Systemic and arteriolar responses to BRL 38227 were similarly decreased. The increase in blood pressure after phenylephrine was greater in control rats than in diabetic rats, but this drug caused a stronger arteriolar constriction in diabetic animals relative to control animals. Angiotensin II had no effect on vessel diameters in control animals, whereas the highest dose induced a marked vasoconstriction in diabetic rats. Thus, vascular relaxation is impaired in skeletal muscle arterioles from conscious diabetic rats, while constriction to both angiotensin II and phenylephrine is increased. Syste-

mic responses to these vasopressor agents, however, are unchanged or even decreased. These findings point to significant functional disturbances of vasoregulatory mechanisms in experimental diabetes, which are not limited to the endothelium.

Chapter 4 and *chapter 5* deal with alterations in vascular permeability as a result of diabetes. It has been demonstrated in experimental studies that increased vascular permeability develops already shortly after diabetes induction. In parallel with the development of increased protein leakage across the vessel wall albuminuria develops. Albuminuria and increased vascular albumin leakage are both believed to be markers of generalized vascular damage. Treatments which prevent the development of this generalized vascular "leakiness" would be of considerable importance. In *chapter 4* the effects of angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibition are studied. The anti-proteinuric effect of ACE-inhibitor therapy is well established. Diabetic rats were treated with saline, perindoprilat, or hydralazine. After 6-8 weeks, blood pressures were equally reduced in the perindoprilat- and hydralazine-treated groups. 24 h Urinary protein and albumin excretion were increased in diabetic rats compared to control rats. Hydralazine did not reduce 24 h protein nor albumin excretion, whereas perindoprilat treatment reduced both to levels comparable to those of control rats. Regional albumin clearances, assessed in the eye, ileum, lung, skeletal muscle and skin, were clearly elevated in diabetic rats compared to control rats; However, neither drug had any effect on albumin clearance. This indicates that ACE-inhibition despite its beneficial effects on urinary albumin excretion can not prevent the development of vascular leakage induced by diabetes. At the same time our results indicate that increased protein leakage across the vascular wall and increased renal albumin loss are not simply exponents of the same vascular disturbances.

Advanced glycosylation endproduct-formation is thought to play a role in the development of diabetic angiopathy. By altering the structure of different extracellular matrix components advanced glycosylation endproducts might affect vascular and glomerular permeability. In *chapter 5* we investigated the effect of treatment with an inhibitor of advanced glycosylation endproduct-formation, aminoguanidine, on vascular permeability and the development of albuminuria using the same study design as in the previous study. Mean arterial pressure in the diabetic group was significantly lower than in the control and aminoguanidine-treated group. Regional albumin clearances were significantly increased in all tissues of diabetic rats compared to control rats. Aminoguanidine treatment of diabetic rats prevented the development of increased regional albumin clearance in all tissues except the lung. The development of albuminuria, however, was not affected.

Since processes such as glycosylation might induce marked structural modification of important vessel wall proteins and thus might influence functional arterial wall properties, we investigated the effects of experimental diabetes on arterial mechanical properties in diabetic and non-diabetic male Wistar Rp rats, using two independent methods: determination of characteristic impedance of the ascending aorta, as well as carotid artery compliance (*chapter 6*).

The first variable was determined from phasic recordings of pressure and flow in the ascending aorta. Simultaneously, parameters of general cardiovascular function, i.e. blood pressure, heart rate, cardiac output, and total peripheral resistance were measured. Carotid compliance was determined in situ under control conditions and after poisoning of the smooth muscle mass with potassium cyanide. Diabetes was found to have marked effects on cardiovascular homeostasis. Carotid compliance was significantly lower in diabetic rats compared with control rats at all pressure levels, both under control conditions and after treatment with KCN. Characteristic impedance of the ascending aorta was higher in the diabetic group. From these observations we conclude that arterial wall compliance is decreased in diabetic rats. The observed compliance changes might have important effects on cardiovascular function in diabetes. In view of our hypothesis that glycosylation or so-called Advanced Glycosylation Endproduct (AGE)-formation might lead to structural modification of vascular wall proteins resulting in decreased vascular elasticity we were interested in the effects of treatment with an inhibitor of these glycosylation processes, aminoguanidine. In *chapter 7* we demonstrated that treatment of diabetic rats with aminoguanidine resulted in a significant increase in carotid static compliance (+39%, under control conditions, and +27%, after abolition of vascular tone by KCN), and a decrease in characteristic aortic input impedance (-40%). The arterial pulse pressure in aminoguanidine treated rats was decreased by about 15%, and the pulsatile component of left ventricular power output was relatively diminished (-35%). In addition, we observed a lower fluid filtration across the carotid wall. These results indicate an increased vascular elasticity, an improved left ventricular-arterial coupling, and a decreased vascular permeability in diabetic rats following aminoguanidine treatment, suggesting that AGE-accumulation on collagen negatively affects arterial wall properties in experimental diabetes.

In this thesis studies are presented concerning different aspects of diabetic angiopathy. We demonstrated that microvascular alterations develop already shortly after diabetes induction, and showed that in striated muscle diabetes mellitus leads to vasoconstriction in contrast to many studies reporting vasodilation in (experimental) diabetes. Vascular reactivity is also affected by diabetes induction and implies alterations in both endothelium-dependent and endothelium independent vasoreactivity. Vascular permeability is increased, and ACE-

inhibitor treatment prevents the development of albuminuria but not of general albumin leakage. Aminoguanidine treatment, in contrast, did prevent the increase of general albumin leakage. Aminoguanidine also has advantageous effects on arterial elasticity. In view of these effects, this drug or its derivatives may be effective in the treatment of diabetic angiopathy. However, its beneficial effects and safety first have to be confirmed in human studies.

SAMENVATTING

Diabetes mellitus of suikerziekte komt relatief vaak voor in de algemene bevolking. Twee verschillende vormen kunnen worden onderscheiden. Insuline-afhankelijke diabetes mellitus (IADM) wordt gekenmerkt door het ontstaan op jeugdige leeftijd waarbij er een absoluut insuline tekort bestaat dat wordt veroorzaakt door destructie van de insuline producerende β -cellen van de pancreas. Om te overleven zijn deze patiënten afhankelijk van insuline. De prevalentie van IADM is relatief laag in verhouding tot het voorkomen van niet insuline-afhankelijke diabetes mellitus (NIADM), een aandoening die vooral bij ouderen voorkomt. In NIADM bestaat er een gestoorde insuline secretie waarbij er ook sprake is van een relatieve ongevoeligheid van weefsels voor insuline, hetgeen (deels) samenhangt met de aanwezigheid van overgewicht. Mensen met NIADM kunnen in sommige gevallen worden behandeld met een dieet, maar hebben meestal orale bloedsuiker-verlagende medicatie nodig en soms ook insuline.

Morbiditeit en mortaliteit en dus ook de kwaliteit van leven van patiënten met diabetes mellitus worden in belangrijke mate bepaald door het al dan niet optreden van vasculaire complicaties. Er zijn meerdere uitingsvormen van vaatbeschadiging als gevolg van diabetes die variëren van lichte netvliesbeschadiging en microalbuminurie (albumine-verlies in de urine) tot zeer ernstige aandoeningen zoals nierinsufficiëntie, visusstoornissen ten gevolge van vaatwoekeringen in het netvlies (proliferatieve retinopathie), en atherosclerose. Doordat diabetes mellitus vaak voorkomt en een groot deel van de diabetespatiënten vasculaire complicaties ontwikkelt vormt deze diabetische angiopathie een belangrijk probleem binnen de gezondheidszorg.

Alhoewel men al langere tijd geleden het optreden van diabetische angiopathie heeft onderkend, weten we tot op heden nog steeds niet waardoor deze vaatafwijkingen nu precies ontstaan. Er zijn verschillende mechanismen die mogelijk een rol spelen in de ontwikkeling van diabetische angiopathie. Glycosylering, een proces veroorzaakt door de reactie van circulerende suikers zoals glucose met eiwitten, interfereert met de functie van een aantal systemen die belangrijk zijn in de regulatie van het cardiovasculaire systeem. Toegenomen metabolisme van glucose via de "polyol pathway" kan veranderingen induceren in intracellulaire mechanismen zoals een gestoorde redox potentiaal. Daarnaast kunnen vasoactieve of groeistimulerende hormonen betrokken zijn bij het ontstaan van diabetische angiopathie.

Dit proefschrift beschrijft onderzoek dat is verricht met als doel het nader karakteriseren van diabetische angiopathie, waarbij wij gebruik hebben gemaakt van een diemodel. Met behulp van dit diemodel, de streptozotocine-geïnduceerde diabete rat, was het mogelijk om basale vasculaire veranderingen te beschrijven die ontstaan ten gevolge van diabetes mellitus.

In *hoofdstuk 2* en *hoofdstuk 3* worden de effecten beschreven van diabetes inductie op kleine bloedvaten, arteriolen en venulen, in een preparaat bestaand uit dwarsgestreept spierweefsel, de "dorsale microculatie kamer". Via een operatie wordt dit kamertje geïmplanteerd op de rug van de rat, waarbij zich na de operatie in de kamer een enkele laag spierweefsel bevindt. Aan de kleine vaten in dit preparaat kunnen metingen worden verricht gedurende een periode van 6-8 weken in wakkere ratten. In *hoofdstuk 2* wordt de uitwerking beschreven van diabetes inductie op diameters van arteriolen en venulen alsmede op vaatdichtheid. Diameters werden bepaald van behulp van wekelijks gemaakte video opnames van de preparaten van ratten met en zonder streptozotocine-geïnduceerde diabetes. Het blijkt dat er na diabetes inductie weinig veranderingen in vaatdiameters optreden, en slechts de kleinste arteriolen tekenen van vernauwing vertonen. Behalve de vaatdiameter werd ook de vaatdichtheid in het preparaat bepaald voor en na het induceren van diabetes. De vaatdichtheid werd bepaald door op dia's van de verschillende preparaten met behulp van een raster het aantal vaten te tellen. Bij ratten met diabetes werd na 4 en na 6 weken een toename van het aantal venulen gevonden. Deze resultaten laten zien dat ook in de microcirculatie van dwarsgestreept spierweefsel veranderingen ontstaan op relatief korte termijn na het ontstaan van diabetes mellitus.

In *hoofdstuk 3* worden de effecten beschreven van diabetes inductie op reacties van vaatwand op verschillende stoffen, zoals vaatverwijders en stoffen die tot een vernauwing van de bloedvaten (vasoconstrictie) leiden. De effecten van de vaatverwijders stoffen acetylcholine en BRL 38227, alsmede de effecten van stoffen met een vasoconstrictief effect (phenylephrine en angiotensine II) werden bestudeerd in ratten met en zonder diabetes, in hetzelfde model als hierboven is beschreven.

Het bloeddrukdalend effect van acetylcholine, als ook het vaatverwijderend effect op arteriolen was 30% minder in ratten met diabetes in vergelijking tot ratten uit de controle groep. Ook na toediening van BRL 38227 werden minder sterke effecten geobserveerd in ratten met diabetes. Na het toedienen van phenylephrine en angiotensine II werd echter een veel sterkere vaatvernauwing gevonden in ratten met diabetes. Verrassend genoeg was het effect op de bloeddruk van deze stoffen juist weer veel minder uitgesproken dan in ratten uit de controle groep. Deze bevindingen wijzen erop dat er belangrijke veranderingen in vaatwandreactiviteit van arteriolen ontstaan na diabetes inductie.

Deze veranderingen betreffen zowel endotheel-afhankelijke reactiviteit maar ook endotheel-onafhankelijke vaatwandreactiviteit.

Hoofdstuk 4 en hoofdstuk 5 betreffen veranderingen in vasculaire permeabiliteit ten gevolge van diabetes. Het is al langer bekend dat er toegenomen lekkage van eiwit door de vaatwand bestaat in diersmodellen maar ook bij patiënten met diabetes. Naast het ontstaan van eiwitlekage door de vaatwand ontstaat er ook eiwitverlies via de nier (albuminurie/proteinurie). Beide processen worden gezien als exponenten van eenzelfde proces, te weten gegeneraliseerde vaatbeschadiging als gevolg van diabetes. Medicamenten die deze eiwitlekage zouden kunnen voorkomen of verminderen kunnen van groot belang zijn in de behandeling van patiënten met vasculaire complicaties als gevolg van diabetes mellitus. Van angiotensin convertering enzyme (ACE)-inhibitors is beschreven dat zij albuminurie en proteinurie kunnen reduceren. In *hoofdstuk 4* worden de resultaten beschreven van een studie naar de effecten van behandeling met de ACE-inhibitor perindoprilat op albuminurie en albumine-lekkage door de vaatwand. Albuminurie werd gekwantificeerd door de albumine concentratie te bepalen in de verzamelde 24-uurs urine. Albumine-lekkage werd bepaald in meerdere organen met behulp van radioactief humaan serum albumine. De studies werden 6-8 weken na diabetes-inductie verricht, waarbij de ratten gedurende deze periode ook behandeld werden. Perindoprilat-behandeling voorkwam het ontstaan van albuminurie. De versterkte albumine lekkage door de vaatwand werd echter niet beïnvloed door perindoprilat.

Advanced Glycosylation Endproduct (AGE)-vorming, als uiteindelijk gevolg van glycosylerings-reacties, speelt mogelijk een rol in de ontwikkeling van de verschillende vormen van diabetische angiopathie. Door structurele modificatie van extracellulaire matrix componenten zou AGE-vorming kunnen leiden tot veranderingen in vasculaire en glomerulaire permeabiliteit. In *hoofdstuk 5* hebben we de effecten onderzocht van behandeling met aminoguanidine, een stof die vorming van AGE-produkten tegengaat. De studie opzet was vergelijkbaar met de hierboven beschreven studie. In tegenstelling tot de effecten van ACE-remming resulteerde aminoguanidine behandeling wel in een normalisatie van de versterkte eiwitlekage in de verschillende organen maar was er geen effect op albuminurie. Dit wijst erop dat eiwitlekage door de vaatwand en eiwitverlies via de nier niet eenvoudigweg als markers van hetzelfde pathofysiologisch proces kunnen worden gezien, en differentieel kunnen worden beïnvloed.

Omdat glycosyleringsprocessen kunnen leiden tot modificatie van belangrijke eiwitten in de vaatwand en dus ook tot veranderingen in de fysische eigenschappen van de vaatwand, hebben we in *hoofdstuk 6* de effecten bestudeerd van langer bestaande diabetes (12 weken) in ratten op mechanische eigenschappen van de vaatwand. Er werd gekeken naar effecten van diabetes op

verschillende parameters van vasculaire elasticiteit zoals compliantie van de halsslagader (arteria carotis) en karakteristieke compliantie van de aorta. Deze parameters werden bepaald in verdoofde ratten met behulp van verschillende technieken zoals intravasculaire drukmetingen en het meten van flow middels een Doppler probe. Er werden aanwijzingen gevonden dat er in langer bestaande experimentele diabetes sprake is van een verminderde elasticiteit van het vaatstelsel. Deze verminderde elasticiteit van de vaatwand heeft belangrijke negatieve consequenties voor het functioneren van onder andere het hart. Of de beschreven veranderingen in arteriële elasticiteit nu werkelijk veroorzaakt worden door AGE-vorming in de vaatwand hebben we trachten te bestuderen in *hoofdstuk 7*. In dit hoofdstuk zijn de resultaten beschreven van aminoguanidine-behandeling, en dus inhibitie van AGE-vorming, op de hierboven beschreven parameters van vasculaire elasticiteit in ratten met een relatief langere diabetesduur. Aminoguanidine behandeling leidde tot een aanzienlijke verbetering van de vasculaire elasticiteit, hetgeen erop duidt dat AGE-vorming in de vaatwand belangrijke negatieve effecten heeft op vaatwandelasticiteit. Daarnaast bleek aminoguanidine ook nog een gunstig effect te hebben op filtratie van vloeistof door de vaatwand.

Samenvattend wordt in dit proefschrift onderzoek beschreven naar verschillende aspecten van diabetische angiopathie. We hebben aangetoond dat er al kort na het ontstaan van diabetes in de microcirculatie veranderingen optreden. In dwarsgestreept spierweefsel lijkt er eerder vasoconstrictie te ontstaan, dan de vasodilatatie die in diverse andere studies beschreven wordt. Vasculaire reactiviteit in diabetes mellitus is ook duidelijk gestoord, waarbij veranderingen optreden in zowel endotheel-afhankelijke als endotheel-onafhankelijke reactiviteit. Zoals bekend ontstaat er als gevolg van diabetes een toegenomen eiwitlekage door de vaatwand als uiting van een toegenomen vasculaire permeabiliteit, met ook een toegenomen eiwitverlies (albuminurie) via de nier. Behandeling met de ACE-inhibitor perindoprilat heeft een gunstig effect op albuminurie maar niet op gegeneraliseerde eiwitlekage, terwijl aminoguanidine de toegenomen vasculaire permeabiliteit wel normaliseert. Aminoguanidine heeft ook gunstige effecten op de verminderde arteriële elasticiteit die ontstaat ten gevolge van langdurige diabetes mellitus. Gezien deze gunstige effecten van aminoguanidine lijkt deze stof of een van haar afgeleiden op termijn interessant voor de behandeling van patiënten met diabetische angiopathie. De positieve effecten alsmede de veiligheid van aminoguanidine moeten hiertoe eerst in humane studies worden bevestigd.